Aus der 1. Medizinischen Klinik
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schneider

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VERSCHIEDENER ANTIHYPERTENSIVA AUF DAS CALCIUM-TRANSPORTSYSTEM DES HUMANERYTHROZYTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Jeannette Karpi

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0037

Aus der 1. Medizinischen Klinik
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schneider

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VERSCHIEDENER ANTIHYPERTENSIVA AUF DAS CALCIUM-TRANSPORTSYSTEM DES HUMANERYTHROZYTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Jeannette Karpi

1982

UNIV.
LEIDEN
NBL.

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez. Prof. Dr. E. Schnurr

Korreferent
gez. Prof. Dr. E.-A. Noack

INHALT

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Zur Calcium-abhängigen Vasokonstriktion und -dilatation	1
1.2	Calcium-Transport über die Erythrozytenmembran	2
1.3	Problemstellung	2
2	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	MATERIAL	3
2.1.1	Erythrozyten	3
2.1.2	Wirkstoffe	3
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen	5
2.2	METHODEN	7
2.2.1	Aufbereitung der Erythrozyten	7
2.2.2	Versuchsanordnung	7
2.2.2.1	Vorinkubation	7
2.2.2.2	Beladung der Erythrozyten mit Calcium	9
2.2.2.3	Leerwert	9
2.2.2.4	Calcium-Ausstrom und Probenentnahme	9
2.2.2.5	Aufbereitung der Proben	1o
2.2.2.6	Zusatz von Wirkstoffen	1o
2.2.3	Bestimmungen	11
2.2.3.1	Hämoglobin-Bestimmung	11
2.2.3.2	Calcium-Bestimmung	11
2.2.4	Auswertung	11
2.2.4.1	Berechnungen	11
2.2.4.2	Statistische Methoden	14

		Seite
3	ERGEBNISSE	15
3.1	Versuche ohne Wirkstoffzugabe	15
3.1.1	Effektivität der Beladung	15
3.1.2	Bedeutung des Leerwertes	16
3.1.3	Ausstromverhalten	19
3.1.4	Schlußbemerkungen	22
3.2	Versuche mit Wirkstoffzusatz	23
3.2.1	Kontrollwerte	23
3.2.2	Calcium-Ausstrom und Wirkstoffkonzentration	24
3.2.3	Ausstromverhalten nach Zusatz von	25
3.2.3.1	Apresolin	25
3.2.3.2	Minoxidil	28
3.2.3.3	Propyldazin	3o
3.2.4	Vergleich	32
3.2.5	Schlußbemerkungen	34
4	DISKUSSION	35
4.1	Zur Methodik	35
4.2	Calcium-Ausstrom ohne Wirkstoffzusatz	37
4.3	Mögliche Angriffspunkte der medikamentösen Beeinflussung der Vasodilatation	38
4.4	Wirkungen von Apresolin, Minoxidil und Propyldazin	4o
4.5	Zur Wirkung der untersuchten Pharmaka auf den Calcium-Transport des Erythrozyten	42
4.6	Schluß	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	46
6	LITERATUR	47

1
EINLEITUNG

1.1
Zur Calcium-abhängigen Vasokonstriktion und -dilatation

Der periphere Gefäßwiderstand wird durch ein Zusammenspiel von Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäßwand moduliert (1-14).
Zur Kontraktion und damit zur Erhöhung des peripheren Widerstandes ist eine Erhöhung des intrazellulären freien Calcium-Gehaltes notwendig (1-15). Dadurch wird über Calmodulin die hemmende Wirkung des Troponin-Tropomyosin-Systems auf die Actomyosin-Mg^{2+}-ATPase-Reaktion, die den Kontraktionszyklus einleitet, aufgehoben (1-28).
Dabei kann Ca^{2+} aus folgenden Speichern freigesetzt werden:
- aus membranären Speichern (4,15,29),
- aus dem Sarkomplasmatischen Retikulum (4,8,14,15,22-24, 3o-33),
- aus den Mitochondrien (4,14,15,22-24,29,31-34).

Zur Relaxation kommt es durch Reduktion des cytoplasmatischen Ca^{2+} (1-16,22-25), einerseits durch Aufnahme von Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher (4,8,15,24,3o-34) des Sarkoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, andererseits durch eine aktive Ca^{2+}-Extrusion über eine ATP-abhängige membranständige Ca^{2+}-Pumpe (8,2o,26-28,3o, 35,36).
In der Klinik werden seit langem zur Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes bestimmte Antihypertensiva, sogenannte Vasodilatatoren, eingesetzt (37-64).
Es ist jedoch nicht bekannt, worauf ihr Gefäßmuskel-relaxierender Effekt beruht. Ein möglicher Angriffspunkt ist die Beeinflussung des transmembranären Ca^{2+}-Transports.

1.2

Calcium - Transport über die Erythrozytenmembran

Aussagen über Ca^{2+} - Bewegungen an der Zellmembran sind an intakten Muskelzellen nur schwer zu gewinnen, da die entsprechenden Präparate schwierig darzustellen sind und die Untersuchungen durch die Ca^{2+} - Kompartimentierung im Sarkoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien erschwert werden (65).
Dagegen stehen mit den Erythrozyten relativ einfach gebaute zelluläre Elemente zur Verfügung, die leicht gewonnen werden können und ein mit der Muskelzellmembran vergleichbares und effektives Ca^{2+} - Transportsystem besitzen (65).
Da die Erythrozyten keine Organelle wie das Sarkoplasmatische Retikulum oder Mitochondrien besitzen und damit die intrazelluläre Ca^{2+} - Kompartimentierung in solchen Strukturen nicht möglich ist, stellen sie ein geeignetes Objekt dar, um Einflüsse auf den transmembranären Ca^{2+} - Transport zu untersuchen.

1.3

Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluß der vasodilatatorisch wirksamen Pharmaka Apresolin, Propyldazin und Minoxidil auf die Komponente "Membrantransport" der intrazellulären Ca^{2+} - Regulation unabhängig von sonstigen Ca^{2+} - Bewegungen in der Zelle zu untersuchen.
Dazu soll ihre Wirkung auf die Ausstromkinetik von Ca^{2+} - beladenen Humanerythrozyten geprüft werden.

2
MATERIAL UND METHODEN

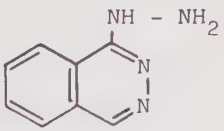
2.1
MATERIAL

2.1.1
Erythrozyten

Für die Versuche wurden menschliche, bis zu drei Tagen ausdatierte Erythrozyten-Konzentrat Konserven von der Blutbank der Universität Düsseldorf verwendet.

2.1.2
Wirkstoffe

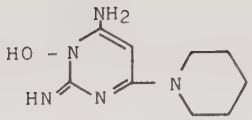
Als Wirkstoffe wurden die Vasodilatatoren Apresolin (Ciba Geigy, Wehr/Baden), Minoxidil (Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA) und Propyldazin (Sanol-Schwarz, Monheim) zugesetzt. Die Strukturformeln sind in den Abbildungen 1-3 dargestellt.



A P R E S O L I N

Abbildung 1

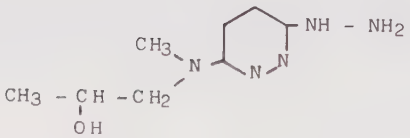
Strukturformel von Apresolin
(1- Hydrazinopthalazin)



MINOXIDIL

Abbildung 2

Strukturformel von Minoxidil
(6- Amino- 1,2- dihydro- 1- hydroxy-
2- amino- 4- piperidiopyrimidin)



PROPYLDAZIN

Abbildung 3

Strukturformel von Propyldazin
(3- Hydrazino- 6-(N- methyl- N- propan-
2- ol) amino- perhydropyridazin)

2.1.3

Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen

Falls im Text nicht gesondert vermerkt, handelt es sich bei den verwendeten Chemikalien und Reagenzien um Produkte der Firmen Merck, Darmstadt, und Serva, Heidelberg, in p.a. Qualität.
Zur Inkubation und zur Behandlung der Versuchsansätze wurden folgende Puffer hergestellt:

- Zur Vorinkubation ein Tris-Inosin-Puffer:

	mmol/l
NaCl	145
KCl	5
$MgCl_2$	2
Inosin	1o
Tris	1o

Der pH von 7.4 wurde durch Zusatz von 1 mol HCl/l bei 37°C eingestellt.

- Zur Beladung der Erythrozyten mit Ca^{2+} ein Tris-Salicylat-Calcium-Puffer:

	mmol/l
Na-Salicylat	15o
$MgCl_2$	2
$CaCl_2$	5
Tris	5

Der pH 7.4 wurde mit 1 mol HCl/l bei 0°C eingestellt.

- Als Kontroll-Puffer ein Tris-Salicylat-Puffer:

	mmol/l
Na-Salicylat	15o
$MgCl_2$	2
Tris	5

Der pH 7.4 wurde mit 1 mol HCl/l bei $0^{o}C$ eingestellt.

- Als Wasch-Puffer, um das Na-Salicylat nach der Beladung wieder zu entfernen, ein Tris-Puffer:

	mmol/l
NaCl	145
KCl	5
$MgCl_2$	2
Tris	1o

Der pH von 7.4 wird mit 1 mol HCl/l bei $0^{o}C$ eingestellt.

- Zum Ca^{2+} - Ausstrom ein Tris-Inosin-Calcium Puffer:

	mmol/l
NaCl	145
KCl	5
$MgCl_2$	2
$CaCl_2$	1
Inosin	1o
Tris	1o

Der pH von 7.4 bzw. von 6.4 wurde mit 1 mol HCl/l bei $37^{o}C$ eingestellt.

2.2
METHODEN

Die Versuchsanordnung wurde modifiziert nach Methoden von Schatzmann et al. (65) und Bürgin et al. (66).

2.2.1
Aufbereitung der Erythrozyten

Die Erythrozyten werden bei 2ooo x g 1o min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand und die Leukozytenschicht werden vorsichtig abgesaugt.
Die Zellen werden in 4fachem Volumen o.154 mol NaCl/l aufgenommen, vorsichtig suspendiert und bei 2ooo x g 1o min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird noch dreimal wiederholt.
Danach bleiben die Erythrozyten in dem 4fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung (o.154 mol/l) 24 Stunden im Kühlschrank zur Substratverarmung stehen (4°C).
Zur Weiterverarbeitung siehe 2.2.2.1.

2.2.2
Versuchsanordnung

2.2.2.1
Vorinkubation

Die Erythrozyten werden bei 2ooo x g 1o min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen.
Die Zellen werden dann in dem 1ofachen Volumen Tris-Inosin-Puffer aufgenommen und bei 37°C 2 Stunden unter regelmäßigem vorsichtigem Umschütteln im Wasserbad vorinkubiert.

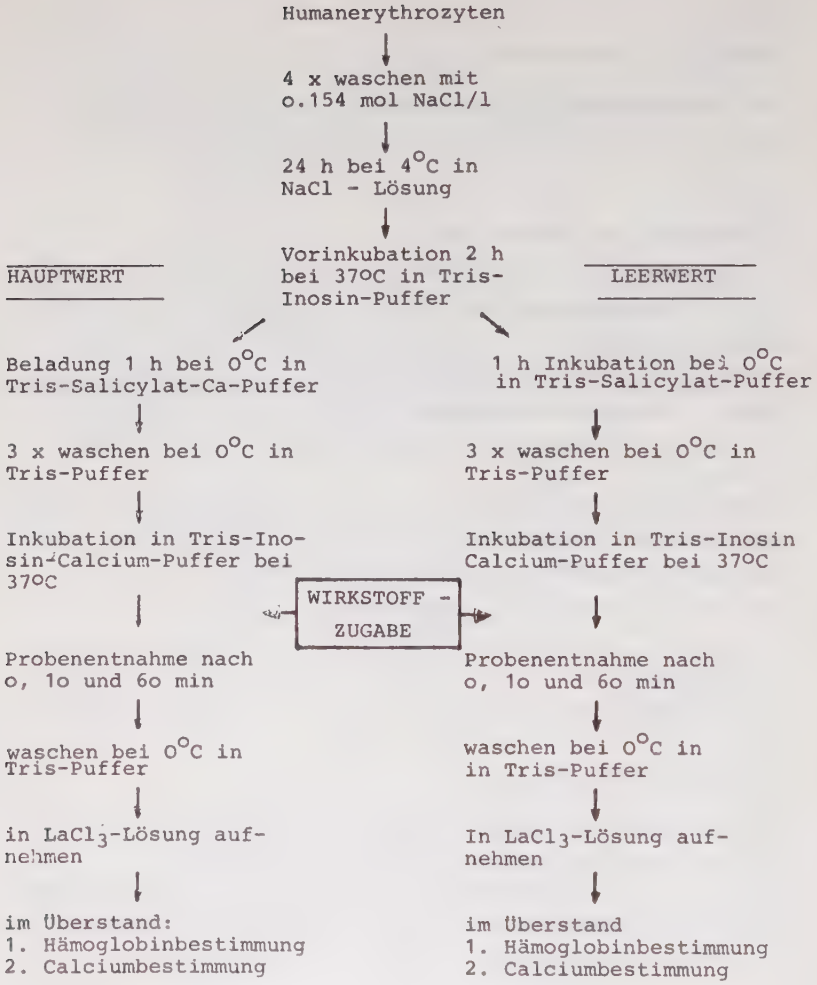


Abbildung 4

Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Durch Zentrifugation werden die Zellen jeweils von Überstand abgetrennt und das Sediment weiter verwendet. Nähere Erläuterungen im Text.

2.2.2.2
Beladung der Erythrozyten mit Calcium

Durch 1o minütiges Zentrifugieren bei 2ooo x g werden die Zellen vom Medium getrennt. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen.
Ohne vorheriges Waschen werden die Zellen dann 1 Stunde bei $0^{o}C$ im Eiswasserbad unter ständigem leichtem Schütteln in dem 1ofachen Volumen Tris-Salicylat-Calcium-Puffer inkubiert. Um das Salicylat wieder zu entfernen, werden die Erythrozyten im 4fachen Volumen Tris-Puffer bei $0^{o}C$ dreimal gewaschen.

2.2.2.3
Leerwert

Um die nach dem Waschen noch vorhandene extrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration zu bestimmen, werden Erythrozyten unter den gleichen Bedingungen in Tris-Salicylat-Puffer inkubiert und danach genau so weiterbehandelt wie die mit Ca^{2+}-beladenen Erythrozyten.

2.2.2.4
Calcium - Ausstrom und Probenentnahme

Jeweils 2o ml Erythrozyten werden bei $0^{o}C$ in 2oo ml Tris-Inosin-Calcium-Puffer mit pH 7.4 aufgenommen und bei $37^{o}C$ im Schüttelwasserbad inkubiert.
Zum Zeitpunkt 0, 1o und 6o min werden je 2 Proben aus jedem Ansatz entnommen, sofort bei $0^{o}C$ in der Kühlzentrifuge bei 2ooo x g 1o min zentrifugiert und der Überstand verworfen.
Jede Probe wird einmal bei $0^{o}C$ mit Tris-Puffer gewaschen.

2.2.2.5
Aufbereitung der Proben

Aus jeder Probe werden o.2 ml Zellen mit 4.o ml $LaCl_3$ (5o mmol/l) aufgenommen und gut gemischt. Die Erythrozyten hämolysieren dabei vollständig.
In jeder Probe wird nach 2.2.3.1 der Hämoglobin-Gehalt bestimmt. Danach werden die Proben bei 5ooo x g zentrifugiert. Das Sediment aus Erythrozytenmembranen wird verworfen und der Überstand weiterverwendet.

2.2.2.6
Zusatz von Wirkstoffen

Werden die in 2.1.2 genannten Pharmaka zugesetzt, dann ändert sich die Versuchsanordnung für die Bestimmung des Ca^{2+}-Ausstroms.
Aus den beiden Ansätzen der mit Ca^{2+} beladenen und der unbeladenen Erythrozyten werden für Medikamentendkonzentrationen im Test von 5 x $1o^{-7}$ bis 5 x $1o^{-2}$ g/l je 4 ml Zellen bei $O^{o}C$ in 39 ml Tris-Inosin-Calcium-Puffer aufgenommen. Entsprechend des Löslichkeitsoptimums von Apresolin und Propyldazin hatte der Puffer einen pH von 6.4, bei Minoxidil dagegen 7.4.
Dann wird 1 ml des gelösten Wirkstoffes zugegeben und im Schüttelwasserbad bei $37^{o}C$ inkubiert. Die weitere Versuchsdurchführung und die Probenentnahme erfolgte dann wie in Abschnitt 2.2.2.4 und 2.2.2.5 beschrieben.
Zur Herstellung der Wirkstofflösungen werden 22.5 mg des jeweiligen Medikaments in 1o ml Tris-Inosin-Calcium-Puffer bei pH 6.4 bzw. 7.4 gelöst. Von dieser Stammlösung wird die Verdünnungsreihe hergestellt.

2.2.3
Bestimmungen

2.2.3.1
Hämoglobin-Bestimmung

Aus den Proben (s. 2.2.2.5) werden zur Hämoglobin-Bestimmung je 2o µl entnommen und mit Ferricyanid nach (67) bei 546 nm spektrophotometrisch bestimmt.

2.2.3.2
Calcium-Bestimmung

In den nach 2.2.2.5 aufbereiteten Proben wird die Ca^{2+}-Konzentration mit einem Atomabsorptionsphotometer der Firma Perkin-Elmer, Friedrichshafen, anhand einer Eichkurve bestimmt.

2.2.4
Auswertung

2.2.4.1
Berechnungen

Die Konzentration des Hämoglobins in der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$c_{Hb} = 36.77 \times E$$

c_{Hb}: Hämoglobin-Konzentration in g/1oo ml,
E : Extinktion bei 546 nm.
Die Erythrozyten in der zur Ca^{2+}-Bestimmung verwendeten Probe sind 1:21 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wird berücksichtigt:

$$CaPr = CaA_t \times 21$$

$CaPr_t$: um den Verdünnungsfaktor korrigierte Ca^{2+} - Konzentration der Probe in mmol/l,
CaA_t : mittels der Eichkurve bestimmte Ca^{2+} - Konzentration der Probe in mmol/l,
t : Zeitpunkt der Probenentnahme in Minuten, entspricht der Dauer des Calcium-Ausstroms.

Aus manuell-technischen Gründen sind die Endkonzentrationen der Erythrozyten nicht gleich. Der Ca^{2+}- Gehalt wird deshalb auf g Hämoglobin berechnet nach:

$$CaHb_t = \frac{CaPr_t}{HbA_t} \times 1o$$

$CaHb_t$: Ca^{2+}-Konzentration in mmol/g Hämoglobin,
HbA_t : In der jeweiligen Probe gemessener Hämoglobingehalt in g/1oo ml.

Durch einmaliges Waschen und Zentrifugieren nach dem Calcium-Ausstrom wird das extrazelluläre Calcium nicht vollständig entfernt. Um die wahren Calcium-Konzentrationen zu erhalten, werden daher Leerwerte aus gleichbehandelten, nicht mit Calcium beladenen Erythrozyten bestimmt und abgezogen. Die Calcium-Konzentrationen in den Leerwerten nach o, 1o und 6o min sind annähernd gleich. Diese Werte werden daher gemittelt, ebenso die dazugehörigen Hämoglobinwerte, daher gilt:

$$A_x = \frac{CaB_o + CaB_{1o} + CaB_{6o}}{3}$$

A_x : gemittelte Calcium-Konzentration aus den nicht beladenen Erythrozyten bei o, 1o und 6o min in mmol/l,
$CaB_{o,1o,6o}$: mittels der Eichkurve bestimmte Calcium-Konzentration bei o, 1o und 6o min in mmol/l.

Für den Hämoglobingehalt gilt:

$$Hb_x = \frac{HbB_o + HbB_{1o} + HbB_{6o}}{3}$$

Hb_x : gemittelter Hämoglobin-Gehalt aus den nicht beladenen Erythrozyten bei o, 1o und 6o min in g/1oo ml.
$HbB_{o,1o,6o}$: Hämoglobingehalt bei o, 1o und 6o min in g/1oo ml.

Daher ergibt sich der Leerwert wie folgt:

$$L = \frac{A_x \times 21o}{Hb_x}$$

L : Leerwert, Calcium-Konzentration der nicht beladenen Erythrozyten in mmol/g Hämoglobin.

Die absolute Calcium-Konzentration in den beladenen Erythrozyten ergibt sich dann nach:

$$Ca_t = CaHb_t - L$$

Ca_t : absolute Calcium-Konzentration der beladenen Erythrozyten nach o, 1o und 6o min in mmol/ g Hämoglobin.

Zur Darstellung des relativen Ausstromverhaltens wird folgende Größe berechnet:

$$RCa_t = \frac{Ca_t}{Ca_o} \times 1oo$$

RCa_t : relative Calcium-Konzentration nach o, 1o und 6o min in Prozent.

2.2.4.2
Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) im Rechenzentrum der Universität Düsseldorf nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test, dem Mann-Whitney-U-Test und dem Wilcoxon-Rangsummen -W-Test (68).
Als Signifikanzschranke wurde $p < 0{,}05$ gewählt.

3
ERGEBNISSE

3.1
Versuche ohne Wirkstoffzugabe

Bei allen Werten ergab sich eine relativ hohe Standardabweichung. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß eine gewisse individuelle Variabilität der Effektivität der Ca^{2+}-Beladung bei den einzelnen verwendeten Erythrozytenchargen zu beobachten ist.
Die Ausstromkinetik ist jedoch bei den einzelnen Chargen deutlich ausgeprägt und gut zu messen. Unter Verwendung der prozentualen Ausstromwerte sind die Werte vergleichbar.

3.1.1
Effektivität der Beladung

Der Erythrozyt hat einen physiologischen intrazellulären Ca^{2+}-Gehalt von $1o^{-7}$ mol/l und weniger (65).
Mit Hilfe von Natrium-Salicylat kann in dem System eine Ca^{2+}-Konzentration von etwa $1o^{-3}$ mol/l intrazellulär erreicht werden, als das 1o ooofache des physiologischen Wertes. Zur Beladung reicht eine Konzentration von 5 x $1o^{-3}$ mol/l Inkubationsmedium aus.
Aufgrund des hohen intrazellulären Ca^{2+}-Gehaltes und der Aktivität des membranständigen ATP-abhängigen Ca^{2+}-Transportsystems des Erythrozyten kann bei $37^{o}C$ und $1o^{-3}$ mol Ca^{2+}/l Außenmedium eine deutliche Ausstromkinetik beobachtet werden (vergl. Tab. 1).

3.1.2
Bedeutung des Leerwertes

Da nach Scharff (69) die Aktivität der Ca^{2+}-Pumpe des Erythrozyten mit steigender Ca^{2+}-Konzentration im Außenmedium ansteigt, wurde, wie bereits erwähnt, die Ausstromkinetik unter Zusatz von 1 mmol Ca^{2+}/l verfolgt. Nach der Probenentnahme zu den verschiedenen Zeitpunkten wird durch einmaliges Waschen in Ca^{2+}-freiem Puffer die extrazelluläre Ca-Konzentration um über eine Zehnerpotenz vermindert. Allerdings ist eine vollständige Entfernung des extrazellulären Calciums auch durch anschlies-

Inkubationszeit min	mmol Ca^{2+} x g Hb^{-1}	
	nicht beladen	beladen
o	1,66 ± o,o9	4,5o ± o,19
1o	1,71 ± o,o7	2,78 ± o,1o
2o	1,79 ± o,o9	2,5o ± o,13
3o	1,84 ± o,1o	2,57 ± o,2o
4o	1,78 ± o,o7	2,31 ± o,o7
5o	1,82 ± o,o6	2,24 ± o,o9
6o	1,86 ± o,o7	2,21 ± o,o8

Tabelle 1

Calcium-Gehalt beladener und nicht beladener Humanerythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in Ausstrommedium. Der Calcium-Gehalt wurde wie in 2.2.3.2 beschrieben flammenphotometrisch bestimmt. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils 11 Versuchen.

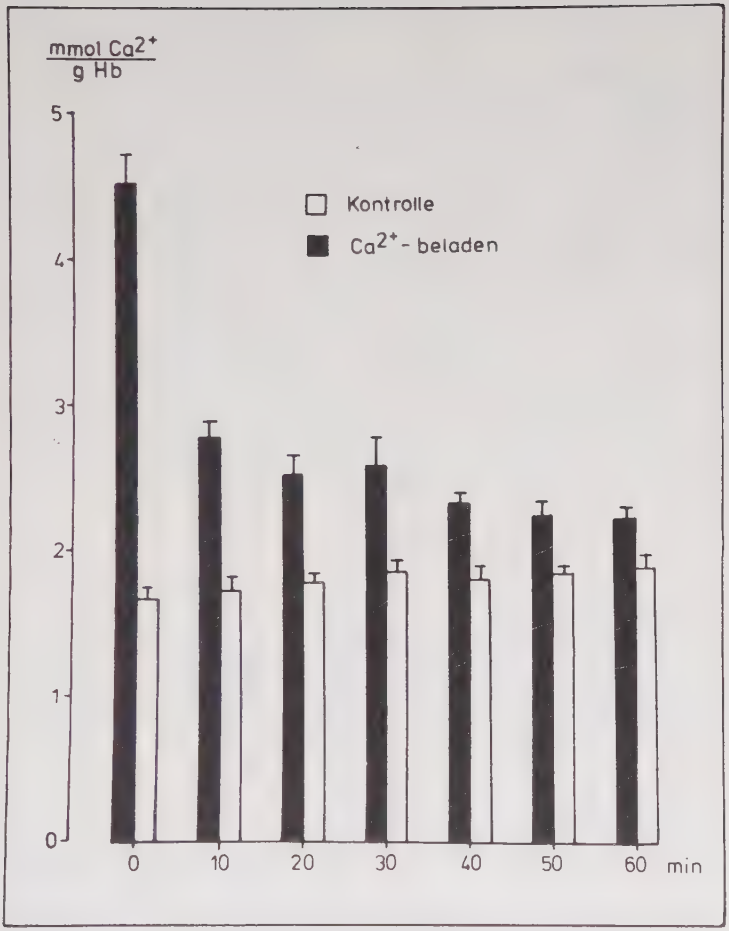


Abbildung 5

Bedeutung der Kontrollwerte bei Ausstromversuchen.
Dargestellt sind die flammenphotometrisch ermittelten Calcium-Gehalte von Calcium-beladenen (schwarze Säulen) und unbeladenen (weiße Säulen) Humanerythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in Ausstrompuffer. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus 11 Versuchen.

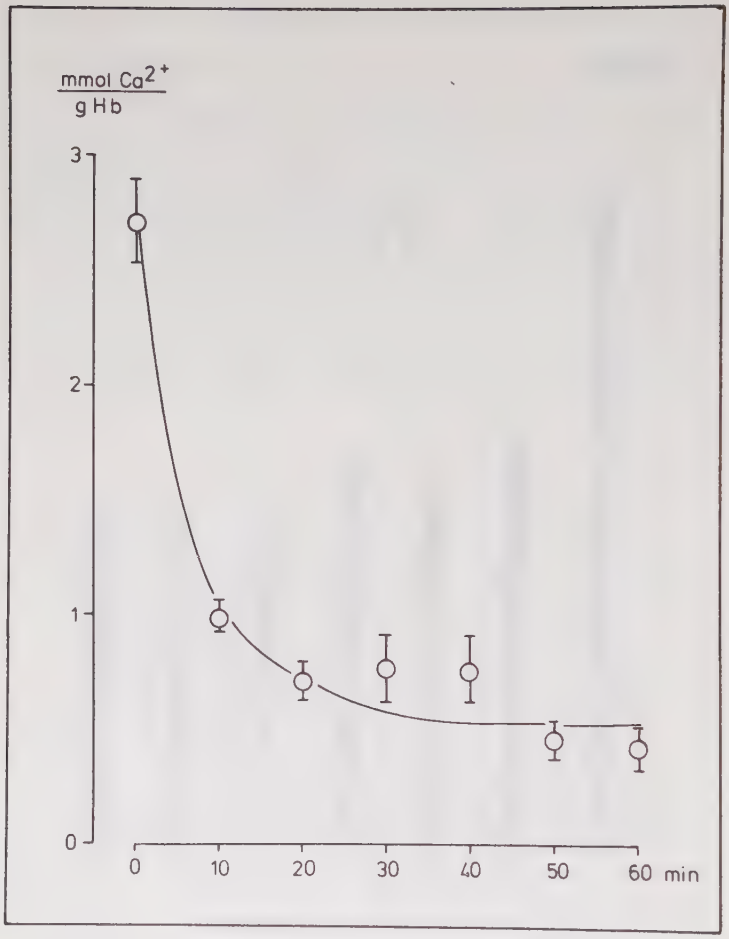


Abbildung 6

Calcium-Transport aus Humanerythrozyten.
Dargestellt sind die um die jeweiligen Leerwerte korrigierten Calcium-Gehalte beladener Humanerythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus 11 Versuchen.

sendes scharfes Zentrifugieren nicht möglich, da immer noch Reste des Mediums zwischen den gepackten Zellen eingeschlossen bleiben.
Zur Korrektur dieses Fehlers wird in parallel laufenden, bis auf die Ca^{2+}-Beladung gleich behandelten Kontrollen die extrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration bestimmt und damit die dazugehörige Probe aus dem Ausstromversuch korrigiert. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt.
Abbildung 5 zeigt die Ca^{2+}-Konzentration der beladenen Zellen während einer Inkubationsdauer von 1 Stunde. Dabei wurden in 1ominütigen Abständen Proben entnommen.
Zum Vergleich sind auch die Kontrollen, d.h. die nicht mit Ca^{2+}-beladenen Parallelproben mit eingezeichnet. Aus der Abbildung geht hervor, daß sich der Ca^{2+}-Gehalt der Leerwerte während der Inkubation nicht ändert, sie können daher für die einzelnen Versuche gemittelt werden.

3.1.3
Ausstromverhalten

Bei 37°C kommt es in Ca^{2+}-haltigem Medium (1 mmol/l) zu einem deutlichen Ca^{2+}-Ausstrom aus den Erythrozyten. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß über einen Zeitraum von 6o Minuten, in 1ominütigen Abständen gemessen, etwa 85 Prozent des Calcium aus der Zelle ausströmt.
Bei einer schnellen Anfangskinetik sind bereits nach 1o Minuten etwa 6o Prozent des gesamten Calciumgehaltes nach außen transportiert.
Nach etwa 4o Minuten ist der Endwert erreicht. Ein weiterer Ca^{2+}-Ausstrom ist nicht mehr zu beobachten.
Um die Ausstromkinetik der einzelnen Versuchsansätze besser vergleichen zu können, wurde im allgemeinen die prozentuale Darstellung verwendet, bei der der Gehalt zu Beginn der Ausstromperiode 1oo gesetzt wurde. In Tabelle 2 sind die absoluten und relativen Ca^{2+}-Gehalte beladener Humanerythrozyten aus den Versuchen ohne Wirkstoffzusatz einander gegenübergestellt.

Inkubationszeit min	Ca^{2+}- Gehalt absolut mmol Ca^{2+} x g Hb^{-1}	relativ %
o	2,7o ± o,19	1oo
1o	o,99 ± o,o6	37,4 ± 2,2
2o	o,72 ± o,o8	28,o ± 4,o
3o	o,78 ± o,15	29,4 ± 5,6
4o	o,78 ± o,15	29,5 ± 5,2
5o	o,45 ± o,o8	16,2 ± 3,5
6o	o,41 ± o,o9	14,7 ± 2,8

Tabelle 2

Absoluter und relativer Calcium-Gehalt beladener Humanerythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in Ausstrompuffer. Die Absolutwerte ergeben sich als Differenz der in Tabelle 1 dargestellten Haupt- und Leerwerte. Der Calcium-Gehalt zu Beginn der Ausstromversuche wurde 1oo Prozent gesetzt. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus 11 Versuchen.

Dà es bei Zusatz von Wirkstoffen sowohl zu einer Änderung der Kinetik, die am besten durch den Unterschied zwischen o und 1o Minuten Inkubation charakterisiert werden kann, als auch zu einer Änderung des Endwertes, der nach 6o Minuten Inkubation sicher erreicht ist, kommen kann, werden im folgenden nur noch die o, 1o und 6o Minuten-Werte gezeigt.

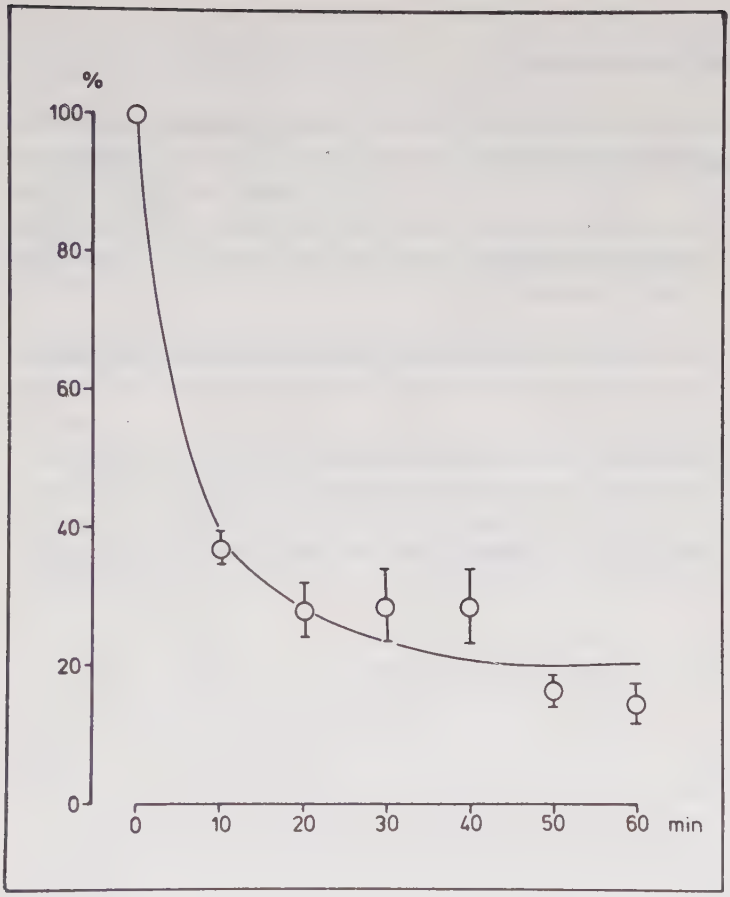


Abbildung 7

Relativer Calcium-Gehalt beladener Humanerythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in Ausstrom-Puffer. Sonstige Angaben wie zu Abbildung 6.

3.1.4
Schlußbemerkungen

Bei den Versuchen ohne Wirkstoffzusatz wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

1. An mittels Natrium-Salicylat beladenen Ca^{2+}-haltigen Humanerythrozyten wurde eine deutliche Ca^{2+}-Ausstrom-kinetik beobachtet.

2. Insgesamt wurden innerhalb von 6o Minuten 85 Prozent des Calciums nach außen transportiert.

3. Innerhalb der ersten 1o Minuten wurde ein Ausstrom von etwa 6o Prozent gemessen.

4. Nach etwa 4o Minuten war der Ca^{2+}-Extrusionsprozess weitgehend abgeschlossen.

3.2
Versuche mit Wirkstoffzusatz

Wie bereits erwähnt, wurden bei den Messungen nach Wirkstoffzusatz nur noch Messungen bei o, 1o und 6o Minuten Inkubationsdauer durchgeführt.

3.2.1
Kontrollwerte

Der Ca^{2+}-Ausstrom unter Medikamentenzusatz wird mit den Ergebnissen aus den Versuchen ohne Wirkstoffzusatz verglichen.
Als Vergleichsdaten dienen die in Tabelle 3 dargestellten Mittelwerte, die aus den Daten der bereits dargestellten Versuche ohne Wirkstoffzusatz und den bei allen Inkubationen mit Wirkstoffzugabe zusätzlich mitgeführten Kontrollen berechnet wurden.

Inkubationszeit min	Ca^{2+}- Gehalt absolut mmol Ca^{2+} x g Hb^{-1}	relativ %
o	1,95 ± o,13	1oo
1o	o,78 ± o,o7	4o,2 ± 3,o
6o	o,41 ± o,o7	19,5 ± 3,1

Tabelle 3

Absoluter und relativer Calcium-Gehalt beladener Humanerythrozyten nach o, 1o und 6o min Inkubation. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus allen Versuchen ohne Wirkstoffzusatz (n = 23).

3.2.2
Calcium-Ausstrom und Wirkstoffkonzentration

Die Pharmaka wurden in einem Konzentrationsbereich von 5×10^{-7} bis 5×10^{-2} g/l dem Ausstrommedium zugesetzt. Als Beispiel sind in Tabelle 4 die absoluten Ca^{2+}-Gehalte der Erythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in Ausstrommedien, denen steigende Konzentrationen von Apresolin zugesetzt waren, wiedergegeben.

Apresolin g x l^{-1}	mmol Ca^{2+} x g Hb^{-1} Inkubationszeit (min)		
	o	1o	6o
5×10^{-7}	2,47 ± o,15	1,35 ± o,o6	o,66 ± o,o6
5×10^{-6}	2,49 ± o,15	1,32 ± o,o5	o,87 ± o,o2
5×10^{-5}	2,49 ± o,24	1,59 ± o,o5	o,98 ± o,17
5×10^{-4}	2,52 ± o,13	1,28 ± o,o8	o,69 ± o,19
5×10^{-3}	2,51 ± o,23	1,37 ± o,o6	o,59 ± o,1o
5×10^{-2}	2,44 ± o,18	1,24 ± o,o4	o,67 ± o,14

Tabelle 4

Wirkung verschiedener Apresolin-Konzentrationen auf den Calcium-Ausstrom beladener Humanerythrozyten. Der Wirkstoff wurde in den angegebenen Konzentrationen bei o min dem Inkubationsmedium zugesetzt. Angegeben sind die Calcium-Gehalte der Erythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils 4 Versuchen.

Aus den in Abschnitt 3.1 genannten Gründen werden die Ca^{2+}-Gehalte der Erythrozyten im folgenden auf den Gehalt zu Beginn des jeweiligen Versuchs bezogen (=1oo %). Die prozentualen Gehalte sind in den Tabellen 5-7 dargestellt.
Aus den Daten in den Tabellen 4-7 geht hervor, daß sich die Ausstromkinetik bei Erhöhung der Konzentration des jeweiligen Wirkstoffes nicht veränderte.
Daher wurde für die graphische Darstellung in den Abbildungen 8-11 die einem Wirkstoff zugehörigen Werte zusammengefaßt und gemittelt.

3.2.3
Ausstromverhalten nach Zusatz von

3.2.3.1
Apresolin

In Tabelle 5 sind die relativen Ca^{2+}-Gehalte der Erythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in Ausstrommedien mit steigender Apresolin-Konzentration aufgeführt.
In Abbildung 8 sind die Daten zusammengefaßt graphisch dargestellt.
Daraus geht hervor, daß sich nach Zugabe von Apresolin zum Ausstrommedium eine deutlich verzögerte Ca^{2+}-Ausstromkinetik beobachten ließ.
Verglichen mit dem Ausstromverhalten der Kontrollen (vergl. 3.2.1) liegen die Ca^{2+}-Gehalte sowohl nach 1o Minuten wie auch nach 6o Minuten Inkubation nach Wirkstoffzusatz signifikant höher ($p < o.oo1$).

Apresolin g x l^{-1}	relativer Calcium-Gehalt (%) Inkubationszeit (min)		
	o	1o	6o
5 x $1o^{-7}$	1oo	55,2 ± 3,3	27,3 ± 3,9
5 x $1o^{-6}$		53,2 ± 2,1	35,5 ± 2,7
5 x $1o^{-5}$		66,4 ± 8,6	42,8 ±11,3
5 x $1o^{-4}$		51,5 ± 6,o	28,8 ± 8,8
5 x $1o^{-3}$		55,6 ± 5,3	25,3 ± 6,4
5 x $1o^{-2}$		51,8 ± 5,2	29,1 ± 7,8

Tabelle 5

Wirkung verschiedener Apresolin-Konzentrationen auf den relativen Calcium-Gehalt beladener Humanerythrozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten im Ausstrompuffer. Der Gehalt bei o min wurde 1oo Prozent gesetzt. Sonstige Angaben wie zu Tabelle 4.

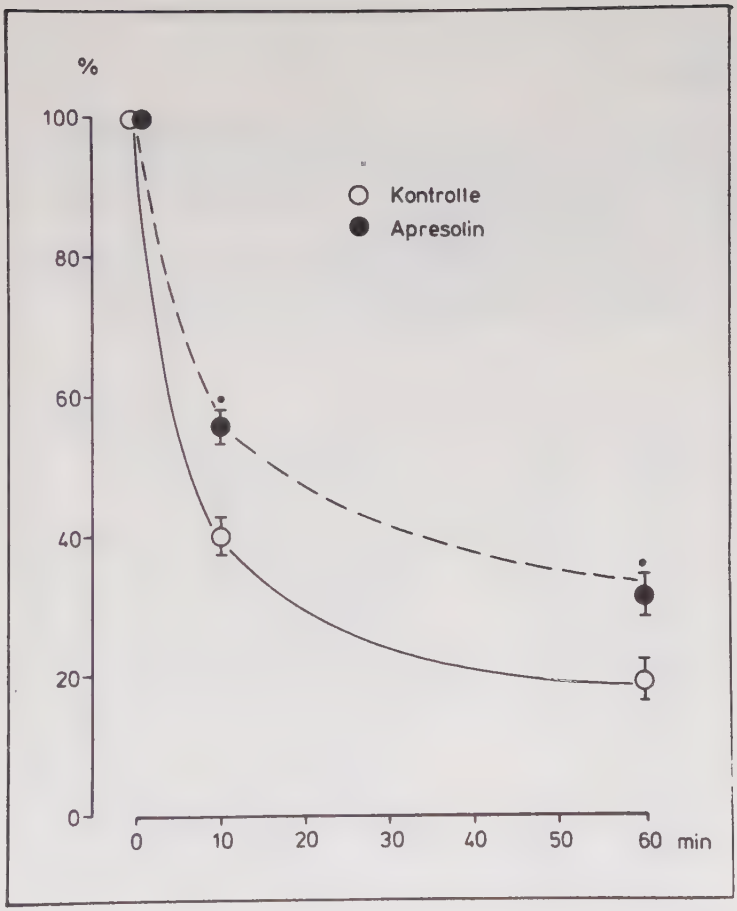


Abbildung 8

Einfluß von Apresolin-Zusatz zum Ausstrommedium auf den Calcium-Transport aus beladenen Humanerythrozyten. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aller Versuche mit (n = 24) und ohne (n = 23) Wirkstoffzusatz.
• signifikant unterschiedlich von der Kontrolle, $p < 0{,}005$.

3.2.3.2
Minoxidil

Nach Minoxidil-Zusatz zeigte die Ausstromkinetik gegenüber der Kontrollgruppe eine geringe Verlangsamung, die jedoch nicht signifikant war. Die Kinetik ist in Abbildung 9 zusammenfassend dargestellt.
Der geringe Unterschied ist vermutlich auf die Variation der verwendeten Erythrozytenchargen zurückzuführen.

Minoxidil $g \times l^{-1}$	relativer Calcium-Gehalt (%) Inkubationszeit (min)		
	0	10	60
5×10^{-7}	100	54,0 ± 23,5	19,5 ± 11,3
5×10^{-6}		43,1 ± 20,3	27,9 ± 16,3
5×10^{-5}		47,0 ± 15,3	26,5 ± 15,3
5×10^{-4}		40,2 ± 14,0	24,8 ± 14,0
5×10^{-3}		42,6 ± 13,5	19,7 ± 11,4
5×10^{-2}		51,9 ± 10,4	23,5 ± 13,7

Tabelle 6

Wirkung verschiedener Minoxidil-Konzentrationen auf den Calcium-Ausstrom aus beladenen Humanerythrozyten. Angegeben sind die relativen Gehalte zu verschiedenen Inkubationszeiten. Sonstige Angaben wie zu Tabelle 5.

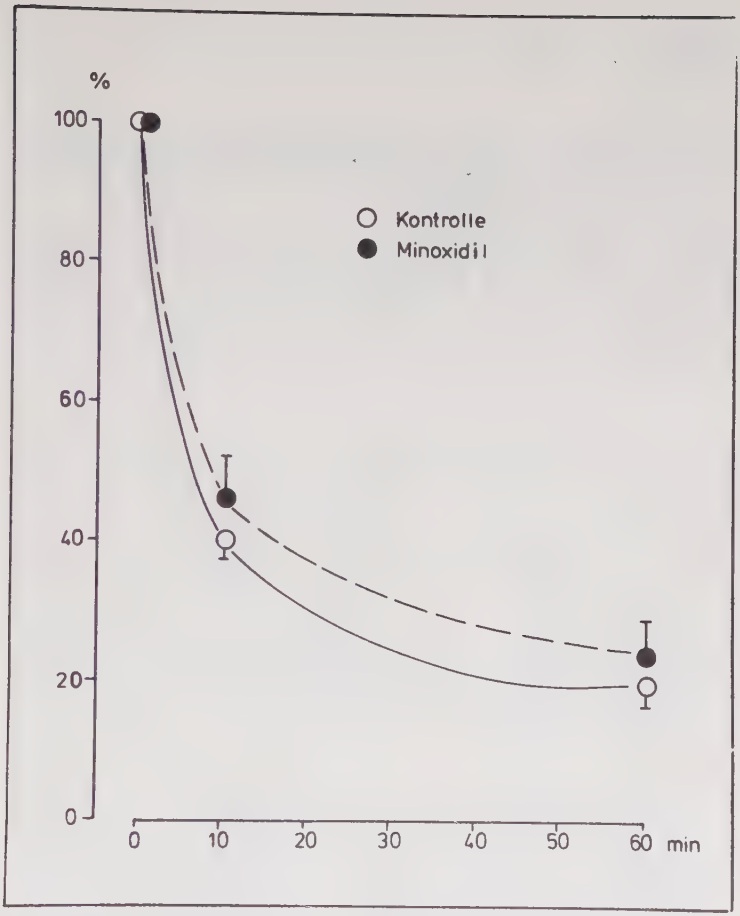


Abbildung 9

Einfluß von Minoxidil-Zusatz zum Ausstrommedium auf den Calcium-Transport beladener Humanerythrozyten. Sonstige Angaben wie zu Abbildung 8.

3.2.3.3
Propyldazin

In Abbildung 1o ist die Ausstromkinetik unter Zusatz von Propyldazin zum Ausstrommedium der Kinetik ohne Wirkstoffzusatz gegenübergestellt.
Die bei verschiedenen Propyldazin-Konzentrationen ermittelten Einzelwerte sind in Tabelle 7 angegeben.
Im Vergleich zu den Kontrollversuchen ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede im Ausstromverhalten.

Propyldazin g x l^{-1}	relativer Calcium-Gehalt (%) Inkubationszeit (min)		
	o	1o	6o
5 x $1o^{-7}$	1oo	44,9 ± 2o,8	19,3 ± 11,5
5 x $1o^{-6}$		37,5 ± 13,9	2o,9 ± 12,8
5 x $1o^{-5}$		42,1 ± 18,9	19,9 ± 13,8
5 x $1o^{-4}$		3o,6 ± 15,o	25,9 ± 15,2
5 x $1o^{-3}$		31.5 ± 17,5	18,1 ± 1o,5
5 x $1o^{-2}$		36,o ± 16,9	18,2 ± 11,9

Tabelle 7

Wirkung verschiedener Propyldazin-Konzentrationen auf den Calcium-Transport beladener Humanerythrozyten. Sonstige Angaben wie zu Tabelle 5.

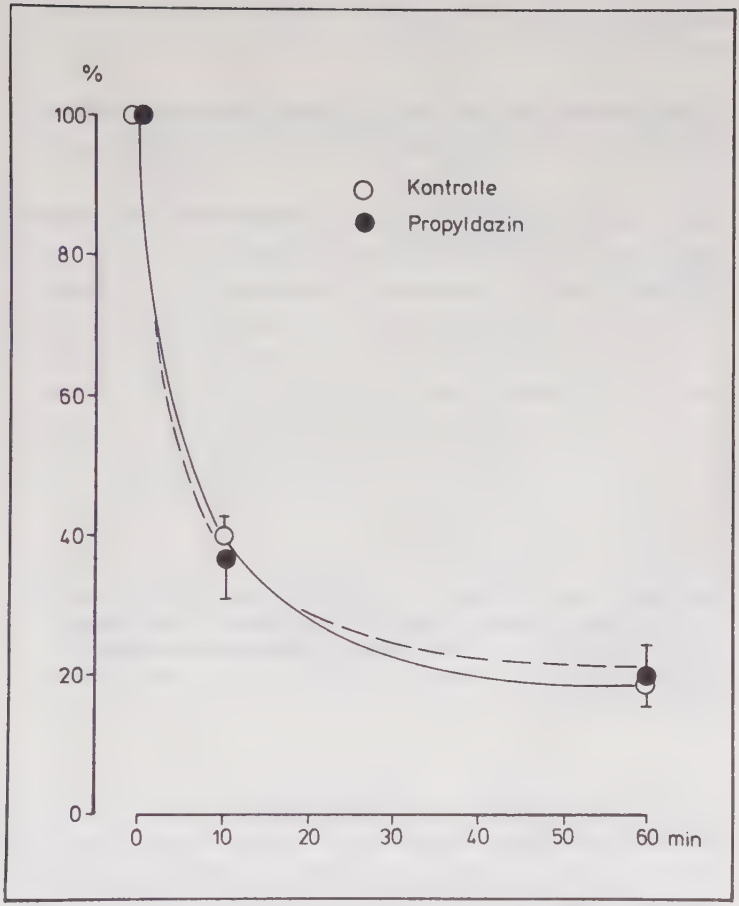


Abbildung 1o

Einfluß von Propyldazin-Zusatz zum Ausstrommedium auf den Calcium-Transport beladener Humanerythrozyten. Sonstige Angaben wie zu Abbildung 8.

3.2.4
Vergleich

In Tabelle 8 sind die jeweils einem Pharmakon zugehörigen und gemittelten Werte zusammenfassend dargestellt.

relativer Calcium-Gehalt nach Inkubation (min)	Zusatz		
	Apresolin	Minoxidil	Propyldazin
o	1oo		
1o	55,6 ± 2,2	46,5 ± 6,1	37,1 ± 6,3
6o	31,5 ± 2,9	23,7 ± 5,o	2o,4 ± 4,6

Tabelle 8

Calcium-Ausstrom aus beladenen Humanerythrozyten nach Wirkstoffzusatz. Angegeben sind die relativen Calcium-Gehalte nach verschiedenen Inkubationszeiten. Da sich kein konzentrationsabhängiger Effekt zeigte, wurden die Werte aller Versuche mit dem jeweiligen Wirkstoff gemittelt ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 24).

Der Ca^{2+}-Ausstrom aus den Erythrozyten wird nach Zusatz von Apresolin sowohl gegenüber den Versuchen mit Minoxidil als auch denen mit Propyldazin-Zusatz signifikant verzögert. Zwischen Minoxidil und Propyldazin ergab sich kein Unterschied hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Ca^{2+}-Transport in das Ausstrommedium.
Der Verlauf des Ausstroms ist in Abbildung 11 für die drei Versuchsreihen mit Wirkstoffzusatz dargestellt.

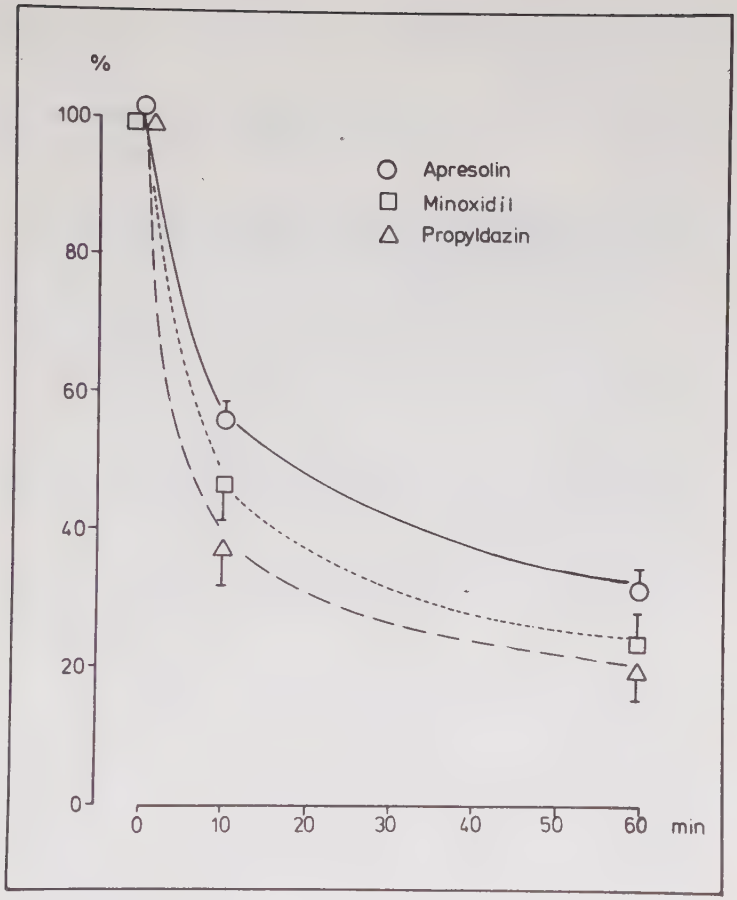


Abbildung 11

Zeitlicher Verlauf des Calcium-Transports aus beladenen Humanerythrozyten nach Zusatz von Apresolin, Minoxidil oder Propyldazin zum Ausstrommedium.

3.2.5
Schlußbemerkungen

Die Versuche mit Wirkstoffzusatz brachten folgende Ergebnisse:

1. Der Ca^{2+}-Ausstrom aus den Erythrozyten wurde durch Konzentrationsänderung des Wirkstoffes im Ausstrommedium nicht beeinflußt.

2. Nach Zugabe von Apresolin ergab sich gegenüber den Kontrollen ein signifikant verzögerter Ausstrom.

3. Nach Zusatz von Minoxidil konnte im Vergleich zu den Kontrollwerten keine Veränderung des Ca^{2+}-Transports aus den Erythrozyten festgestellt werden.

4. Auch nach Zusatz von Propyldazin war kein Unterschied zu messen.

4
DISKUSSION

4.1
Zur Methodik

Der intrazelluläre Ca^{2+}-Gehalt des Erythrozyten ist mit etwa $1o^{-7}$ mol/l um mehrere Zehnerpotenzen niedriger als die des umgebenden Mediums (65).
Für die Struktur und Funktion des Erythrozyten ist die Aufrechterhaltung dieser niedrigen intrazellulären Ca^{2+}-konzentration auch gegen den hohen Konzentrationsgradienten von vitaler Bedeutung, da es bei höheren intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen zur Öffnung der K^+-Kanäle und damit zum Verlust des funktionell wichtigen K^+ kommt und dieses durch Na^+ ersetzt wird (5,7o,71). Dabei kann sich das Cytoskelett des Erythrozyten von der bikonkaven Scheibenform zur Kugelzelle hin verändern, was mit einer Beeinträchtigung der Funktion der Zellmembran verbunden ist (71).
Der Ca^{2+}-Gradient über die Erythrozytenmembran wird durch ein sehr aktives ATP-abhängiges Transportsystem in der Membran aufrechterhalten (8,2o,26-28,3o,35,36). Diese Pumpe führt den Ca^{2+}-Transport in ähnlicher Weise durch wie die der glatten Muskelzelle. Daher steht mit dem Erythrozyten ein relativ einfaches Modell zur Verfügung, an dem Einflüsse auf den Ca^{2+}-Transport über die Zellmembran untersucht werden können.
Erythrozyten sind einfach zu gewinnen und gut zu isolieren. Die Zelle ist anatomisch einfach gebaut und enthält keine Organelle, die durch Ca^{2+}-Akkumulation oder -Freisetzung die Messung komplizieren könnten (65).
Für die Beladung der Erythrozyten mit Ca^{2+} stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, bei denen die Struktur der Zelle weitgehend erhalten und intakt bleibt.

Folgende Verfahren sind beschrieben worden:

- umgekehrte Hämolyse (65,73,74),
- Behandlung mit Ionophoren, z.B. A 23187 (65,75,76),
- Behandlung mit Natrium-Salicylat (65,66,77,78),
- Behandlung mit p-Chloromercuribenzoat (65,73).

Gut durchführbar und effektiv ist die in dieser Arbeit verwendete Methode mit Natrium-Salicylat. Salicylat ist ein "lyotrophisches" Anion und durchdringt die Zellmembran des Erythrozyten bei einem pH von 7.4 sehr rasch (77).
Es konnte gezeigt werden, daß Salicylat den Anionen-Transportmechanismus der Erythrozytenmembran sehr effektiv blockiert, die Permeabilität für alkalische Kationen dagegen steigert (77,78). Bei Zusatz von Salicylat wird darüberhinaus auch die Permeabilität für Ca^{2+}-Ionen gesteigert (79).
Nach der Beladung kann das Salicylat durch einfaches Waschen wieder aus dem Erythrozyten entfernt und damit der Effekt auf die Transportsysteme unter Erhalt der Membranstruktur aufgehoben werden (65).
Wird die Ca^{2+}-Beladung und die nachfolgende Auswaschung bei $0^{o}C$ durchgeführt, so ist bis zur ersten Probenentnahme kein Ca^{2+}-Verlust aus den Erythrozyten zu befürchten, da bei dieser Temperatur das Ca^{2+}-Transportsystem nahezu vollständig inaktiviert ist und somit kein Ausstrom stattfinden kann (65,66).
Die Erythrozyten wurden vor dem Versuch 24 h gehungert, um den ATP-Gehalt zu reduzieren. Nicht gehungerte Erythrozyten transportieren das intrazelluläre Ca^{2+} so schnell nach außen, daß die Messung bei der hier verwendeten Methodik nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit durchzuführen wäre (65).

Da vollständig gehungerte Zellen, die praktisch kein ATP mehr enthalten, das die Ca^{2+}-Pumpe aktiviert, keinen Ca^{2+}-Ausstrom mehr zeigen, wurden die 24 h gehungerten Erythrozyten vor dem Ausstromversuch 2 h bei 37°C mit Inosin-haltigem Medium inkubiert (66).
Nach Bürgin und Schatzmann (66) können sie dann genügend ATP bilden, um die Ca^{2+}-Pumpe einige Zeit zu aktivieren. Diese teilgehungerten Erythrozyten zeigen eine deutliche Ausstromkinetik und scheinen damit durchaus geeignet, wesentliche Unterschiede im Extrusionsverhalten der Ca^{2+}-beladenen Erythrozyten unter veränderten Versuchsbedingungen aufzuzeigen.

4.2
Calcium-Ausstrom ohne Wirkstoffzusatz

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methodik konnte durch Zusatz von Natrium-Salicylat die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration der Humanerythrozyten von etwa $1o^{-7}$ mol/l auf $1o^{-3}$ mol/l, also um das 1o ooofache des physiologischen Wertes gesteigert werden.
Die Effektivität der Ca^{2+}-Beladung stimmt mit den Angaben anderer Autoren, die Salicylat oder andere der im Abschnitt 4.1 beschriebenen Methoden verwendet haben, gut überein (65,66,73-78).
Nach Scharff (69) nimmt die Aktivität der ATP-abhängigen Ca^{2+}-Pumpe des Erythrozyten mit einem Minimum bei $1o^{-7}$ mol Ca^{2+}/l Außenmedium bei ansteigender Ca^{2+}-Konzentration im Medium zu. Die Messung der Ausstromkinetik erfolgte daher bei einem extrazellulären Ca^{2+}-Gehalt von $1o^{-3}$ mol/l Ausstrommedium.
Die Ausstromkinetik der Ca^{2+}-beladenen, teilgehungerten Humanerythrozyten war deutlich zu beobachten. Die Zellen waren in der Lage, einen annähernd physiologischen Ca^{2+}-Gradienten über die Zellmembran wieder aufzubauen.

8o Prozent des Gesamtausstroms war bereits in den ersten zehn Minuten zu messen. Nach 4o Minuten war der Endwert erreicht. Es verblieben dann noch 1o bis 15 Prozent des zu Beginn vorhandenen Ca^{2+} in der Zelle. Ein ähnlicher kinetischer Verlauf wurde auch von Bürgin und Schatzmann (66) beobachtet.

4.3
Mögliche Angriffspunkte der medikamentösen Beeinflussung der Vasodilatation

Bei der Wirkung der an der Gefäßmuskulatur angreifenden Vasodilatatoren sind folgende Angriffspunkte denkbar:

- Wirkung an der Zellmembran:
  Durch Beeinflussung von Ionenpermeabilitäten an der Zellmembran kann eine Veränderung von Aktionspotentialen und eine Erhöhung des Ruhepotentials hervorgerufen werden. Dieser Mechanismus liegt zum Beispiel der Wirkung von Natriumnitroprussid zugrunde (37). Ein ähnlicher Effekt wird durch die Stimulation der membranständigen Na^{+}-K^{+}-ATPase hervorgerufen (37).

- Wirkung auf den Ca^{2+}-Einstrom
  Die sogenannten Ca^{2+}-Antagonisten, wie zum Beispiel Verapamil und D 6oo, hemmen direkt den Ca^{2+}-Einstrom aus dem extrazellulären Raum (29,8o), andere Ca^{2+}-Antagonisten führen zu einer indirekten Hemmung des Ca^{2+}-Einstromes. Damit wird der für die elektromechanische Koppelung notwendige intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel von $1o^{-5}$ mol/l langsamer oder nicht erreicht, was sich als vasodilatatorischer Effekt bemerkbar macht.

- Wirkung auf den intrazellulären Ca^{2+}-Haushalt:
  Durch Translokalisation von Ca^{2+} in das Sarkoplasmatische Retikulum und in die Mitochondrien, z.B. durch Stimulierung der sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Pumpe, kann die intrazelluläre freie Ca^{2+}-Konzentration vermindert werden (81).

- Wirkung auf die Ca^{2+} bindenden Regulatorproteine:
  Man nimmt an, daß durch Bindung von Ca^{2+} an Regulatorproteine indirekt kontraktile Proteine beeinflusst werden, wodurch eine medikamentöse Hemmung der Gefäßmuskelkontraktion möglich ist (21,81).

- Wirkung auf cyclische Nucleotide:
  Von den Analoga 8-Brom-cGMP (82) und Dibutyryl-cAMP (83) wurden relaxierende Effekte auf die Gefäßmuskulatur beschrieben. Es könnte daher ein Zusammenhang zwischen der Steigerung der "second messenger" cGMP und cAMP und der Vasodilatation bestehen (37). cGMP moduliert möglicherweise den Ca^{2+}-Einstrom (38), während cAMP Proteinkinasen aktiviert, die ihrerseits die sarkoplasmatische Ca^{2+}-Pumpe der Gefäßmuskulatur stimulieren (84).
  Eine Hemmung der Phosphodiesterase, die bei höheren intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen auch durch Calmodulin hervorgerufen werden kann, führt zum Anstieg der intrazellulären Konzentration cyclischer Nucleotide und damit zu einer Aktivierung des Ca^{2+}-Transports in den Extrazellulärraum (37).
  Von Pharmaka wie Diazoxid, Theophyllin und Papaverin ist bekannt, daß sie zumindest teilweise über den beschriebenen Mechanismus vasodilatatorisch wirken (37,85).
  Diazoxid konkurriert außerdem mit Ca^{2+}-Ionen um einen für die elektromechanische Koppelung wichtigen, noch nicht

näher charakterisierten "Calcium-Rezeptor" (86), bei dem es sich möglicherweise um Calmodulin handelt.

- Wirkung auf die intrazelluläre Konzentration an freien Ca^{2+}-Ionen:

Von einigen Antihypertensiva, wie z.B. Hydralazin, ist bekannt, daß sie sich in Arterien und Venen anreichern (39-41). Möglicherweise wird durch diese Pharmaka die aktuelle intrazelluläre Konzentration an freien Ca^{2+}-Ionen gesenkt und dadurch der Aktivator für die Gefäßmuskelkontraktion blockiert (4o). Ob und in welcher Weise durch diese Chelatbildung auch die Aktivität des Ca^{2+}-Calmodulin-Komplexes beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

4.4
Wirkung von Apresolin, Minoxidil und Propyldazin

Apresolin

Apresolin oder Hydralazin wird als Kombinationspräparat seit einiger Zeit in der Therapie eingesetzt. Es ist ein oral stark wirksames Antihypertensivum, das über eine dilatatorische Wirkung auf die Gefäßmuskulatur der Arteriolen den peripheren Widerstand senkt (39,42,43,85).
Die Substanz wird zu etwa 9o Prozent im Gastrointestinaltrakt resorbiert (44-46) und liegt im Blut zu etwa 85 Prozent proteingebunden vor (45,47). Sie wird in der Leber metabolisiert und über die Niere ausgeschieden (46,48-5o, 58,87-89).
Die Nebenwirkungen sind zum Teil auf die Weitstellung der Peripherie zurückzuführen. Es kommt zu einer reflektorischen Tachykardie, das Auswurfvolumen sowie der myokardiale O_2-

Verbrauch nehmen zu (39,51-54), was zu Angina pectoris-Anfällen führen kann (55).
Allergische Reaktionen (56) bis zum Vollbild des systemischen Lupus erythematodes acutus (49,51,57,58) wurden nach längerer Gabe von Apresolin ebenfalls beschrieben.
Die Nierendurchblutung wird durch Apresolin gesteigert (54,57).
Um die unerwünschten Wirkungen auf Herz und Kreislauf zu vermeiden, werden Hydralazine in Kombination mit Reserpin oder ß-Blockern, sowie mit Saluretika gegeben (51,57-59,61).
Über den zellulären Wirkungsmechanismus der Hydralazine ist trotz langjähriger klinischer Erfahrung wenig bekannt (5o,6o). Hydralazine bilden Komplexe mit Metallionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} (39-41). Möglicherweise wird dadurch der Aktivator für die Gefäßmuskelkontraktion zumindest teilweise blockiert (39). Therapeutisch wird Apresolin hauptsächlich bei starker Reduktion der Nierenfunktion und bei Präeklampsie eingesetzt (57).

Minoxidil

Minoxidil ist ein oral sehr viel stärker wirksamer Vasodilatator als Apresolin (39). Die Substanz wird in der Leber glucuronidiert und über die Niere ausgeschieden (62).
Durch Senkung des peripheren Widerstandes kommt es zu einer Abnahme des Blutdrucks. Dabei treten Nebenwirkungen im Sinne einer reflektorischen Tachykardie, gesteigertes Auswurfvolumen, verminderte Sauerstoffversorgung des Myokards, die auch zu Angina pectoris-Anfällen führen können, auf (51,62).
Die Nebenwirkungen können durch Kombination mit ß-Blockern beherrscht werden (51).
Durch zusätzliche Gabe von Saluretika kann der unter Minoxidil-Behandlung auftretenden Na^{+}-Retention entgegengewirkt werden (62-64).

Nach längerer Anwendung bei Frauen wurde auch ein Hirsutismus beschrieben (51,62).
Über den zellulären Wirkungsmechanismus von Minoxidil ist ebenfalls wenig bekannt. Es scheint über eine Hemmung des Ca^{2+}-Einstroms in die Gefäßmuskelzelle zu wirken (37). Die Prozesse der intrazellulären Ca^{2+}-Aktivierung werden wahrscheinlich nicht beeinflußt (37). Die Indikation für Minoxidil dürfte voraussichtlich besonders zur Therapie des malignen Hypertonus und zur Kontrolle des Blutdrucks bei Niereninsuffizienten oder beiderseits nephrektomierten Patienten zu stellen sein (62).

Propyldazin

Von Propyldazin kann aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit den Hydralazinen vermutet werden, daß es sich ebenfalls als wirksames Antihypertensivum erweisen könnte (9o,91). Allerdings sind bisher kaum physiologische, pharmakologische oder klinische Testergebnisse verfügbar.

4.5
Zur Wirkung von Apresolin, Minoxidil und Propyldazin auf den Ca^{2+}-Transport des Humanerythrozyten

Apresolin

In Apresolin-haltigem Medium war gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant verlangsamte Ausstromkinetik zu beobachten. Überraschenderweise war aber keine Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes zu messen, obwohl die Wirkstoffkonzentration über 5 Zehnerpotenzen von $5 \times 1o^{-7}$ bis $5 \times 1o^{-2}$ g/l variiert wurde.

In dem verwendeten Inkubationsansatz betrug die mittlere Hämoglobinkonzentration 22 g/l. Da der mittlere Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten mit $3 \times 1o^{-8}$ g angegeben wird, kann daraus für den Inkubationsansatz eine Zelldichte von $6 \times 1o^{8}$ Erythrozyten/l berechnet werden. Andererseits enthält das Medium bereits bei der niedrigsten verwendeten Wirkstoffkonzentration von $5 \times 1o^{-7}$ g/l, entsprechend $3.1 \times 1o^{-9}$ mol/l, eine Konzentration von $1.8 \times 1o^{15}$ Apresolinmoleküle/l. Damit entfallen auf jeden Erythrozyten immerhin noch etwa 3 Millionen Wirkstoffmoleküle, da dem Inkubationsansatz kein Protein zugesetzt war. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die im Ergebnisteil dargestellte signifikante Verminderung des Ca^{2+}-Efflux aus den Erythrozyten durch eine unspezifische Beeinflussung oder eine unspezifische Bindung von Apresolin an das Ca^{2+}-Transportsystem zustandekommt.
Dabei könnten bereits bei der geringen Konzentration von $5 \times 1o^{-7}$ g/l die Bindungsstellen abgesättigt sein.
Diese Überlegungen können das zunächst unerwartete Ergebnis erklären, daß auch bei der Gabe wesentlich höherer Wirkstoffkonzentrationen keine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen war.

Minoxidil und Propyldazin

Nach Inkubation mit Minoxidil oder Propyldazin konnte bei keiner der verwendeten Konzentrationen ein signifikanter Effekt auf das Ca^{2+}-Transportsystem des Humanerythrozyten gemessen werden, obwohl auch hier die Konzentrationen von $5 \times 1o^{-7}$ bis $5 \times 1o^{-2}$ g/l variiert wurden.
Als Erklärung der fehlenden Wirkung von Minoxidil und Propyldazin auch bei hohen Wirkstoffkonzentrationen kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

- Die beiden Pharmaka haben keine Wirkung auf den Ca^{2+}-Transport der Erythrozytenmembran. Dann ist allerdings immer noch nicht völlig auszuschließen, daß auf die membranäre Ca^{2+}-Pumpe der glatten Muskelzelle eine Wirkung ausgeübt werden kann, da sich dieses Transportsystem in einer anderen Umgebung befindet und auch gegenüber dem entsprechenden Transportsystem des Erythrozyten gewisse veränderte Charakteristika aufzuweisen scheint.

- Eventuell dringen die Medikamente zu langsam in die Erythrozyten ein, so daß aufgrund der schnellen Kinetik auch bei teilgehungerten Erythrozyten keine Differenzierung möglich ist.

- Da, zumindest von Minoxidil, ein Metabolismus in der Leber bekannt ist, wäre es denkbar, daß in vivo erst eine Metabolisierung erfolgen muß, oder daß ein Co-Faktor, der im Plasma oder in der Zelle im intakten Organismus bereits vorhanden ist, für die Pharmakawirkung notwendig ist.

- Denkbar ist auch, daß der unphysiologisch hohe Ca^{2+}-Gehalt der Erythrozyten selbst eine Veränderung der Charakteristika der membranständigen Ca^{2+}-Pumpe und ihrer Konformation hervorruft.
  Bekannt ist, daß sich durch Ca^{2+}-Beladung das Cytoskelett der roten Blutzellen von der bikonkaven Scheibenform zur Kugelzelle ändert (71). Dabei könnte es auch zu einer Beeinflussung der an der Innenseite der Zellmembran lokalisierten Vesikel, die anscheinend an der Ca^{2+}-Extrusion beteiligt sind (72), kommen.

4.6
Schluß

Die Untersuchungen zur Wirkung von drei vasodilatatorisch wirkenden Substanzen - Apresolin, Minoxidil und Propyldazin - auf das Ca^{2+}-Transportsystem des Humanerythrozyten haben folgendes ergeben:

Bei Propyldazin und Minoxidil war keine Wirkung auf den Ca^{2+}-Transport beladener Erythrozyten festzustellen. Allerdings ist nicht ganz auszuschließen, daß in vivo der Transportmechanismus an der Membran beeinflusst wird, da die Pharmaka nicht an ihren Wirkort gelangen könnten, Metabolite wirksam sind, Co-Faktoren benötigt werden und/oder der hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Gehalt und die damit verbundene Gestaltsänderung eine Rolle spielen.
Bei Apresolin wurde eine signifikante Hemmung des Ca^{2+}-Transports festgestellt, die weitgehend konzentrationsunabhängig ist. Daher muß ein unspezifischer Effekt, möglicherweise eine Bindung an den Ca^{2+}-Transporter der Erythrozytenmembran in Betracht gezogen werden.
Der vasodilatatorische Effekt der geprüften Wirkstoffe kann bei der Vielfalt der möglichen Angriffspunkte, die ausführlich diskutiert wurden, durchaus auf einem anderen zellulären Mechanismus oder aber auf einer Kombination beruhen.

5
ZUSAMMENFASSUNG

Der zelluläre Mechanismus zahlreicher Pharmaka mit vasodilatatorischer Wirkung ist noch ungeklärt. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluß von Apresolin, Minoxidil und Propyldazin auf den Ca^{2+}-Transport der Zellmembran untersucht. Als Modell wurde der mittels Salicylat Ca^{2+}-beladene, teilgehungerte Humanerythrozyt gewählt und die Ca^{2+}- Ausstromkinetik bestimmt. Die Ergebnisse waren folgende:

1. Unter Zusatz von Natrium-Salicylat konnte der intrazelluläre Ca^{2+}-Gehalt von $1o^{-7}$ mol/l auf $1o^{-3}$ mol/l gesteigert werden.
2. Innerhalb von 1o Minuten wurden etwa 6o Prozent des Ca^{2+} gegen einen Konzentrationsgradienten wieder nach außen transportiert.
4. Nach Zusatz von Minoxidil und Propyldazin in einem Konzentrationsbereich von $5 \times 1o^{-7}$ bis $5 \times 1o^{-2}$ g/l konnte keine Veränderung der Ca^{2+}-Ausstromkinetik festgestellt werden.
5. Nach Zusatz von Apresolin ergab sich ein signifikant verlangsamter Ca^{2+}-Ausstrom bereits bei $5 \times 1o^{-7}$ g Apresolin/l. Der Effekt konnte durch Konzentrationserhöhung nicht weiter gesteigert werden.

Der vasodilatatorische Effekt der geprüften Wirkstoffe kann bei der Vielfalt der möglichen Angriffspunkte, die ausführlich diskutiert wurden, durchaus auf einem anderen zellulären Mechanismus oder einer Kombination beruhen. Der Effekt von Apresolin kommt möglicherweise durch eine unspezifische Bindung an das Transportsystem zustande. Aufgrund der Ergebnisse kann eine direkte Beeinflussung der membranständigen Ca^{2+}-Pumpe in vivo nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist zu vermuten, daß diese nicht der wesentliche Wirkort der geprüften Pharmaka ist.

6
LITERATUR

1. Hilton,S.M., Spyer,K.M.
Central nervous regulation of vascular resistance
Ann. Rev. Physiol. 42 (1980), 399 - 411

2. Donald,D.E., Shepard,J.T.
Autonomic regulation of the peripheral circulation
Ann. Rev. Physiol. 42 (1980), 429 - 439

3. Sparks,H.V., Belloni,F.L.
The peripheral circulation: Local regulation
Ann. Rev. Physiol. 40 (1978), 67 - 92

4. Blaustein,M.P., Lang,S., James-Kracke,M.
Tissue electrolytes: Sodium ions,calcium transport and control of vascular tone
In: Intracellular electrolytes and arterial hypertension (Zumkley,H., Losse,H., Hrsg.)
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart-New York (1980)
24 - 33

5. Grover,A.K., Kwan,C.Y., Crankshaw,J., Crankshaw,D.J., Garfield,R.E., Daniel,E.E.
Characteristics of calcium transport and binding by rat myometrium plasma membrane subfractions
Ann. Physiol. Soc. 35 (1980), C66 - C74

6. Murphy,R.A.
Filament organization and contractile function in vertebrate smooth muscle
Ann. Rev. Physiol. 41 (1979), 737 - 748

7. Mannherz,H.G., Groody,R.S.
Proteins of the contractile system
Ann. Rev. Biochem. 45 (1976), 427 - 466

8. Jones,L.R.
Mg^{2+} and ATP effects on K^{+}- activation of the Ca^{2+}- transport ATPase of cardiac sarcoplasmatic reticulum
Biochim. Biophys. Acta 557 (1979), 230 - 242

9. Chapman,R.A. Tunstall,J.
The interaction of sodium and calcium ions at the cell membrane and the control of contractile strength in frog arterial muscle
J. Physiol. (London) 3o5 (1979), 1o9 - 123

1o. Fleckenstein,A.
Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17 (1979), 149 - 166

11. van Bremen,C., Aronson,P., Loutzenhiser,R., Meisheri,K.
Ca^{2+}- movements in smooth muscle
Chest 78 (198o), 157 - 165

12. Treglan,R.T., Marston,S.B.
The crossbridge theory
Ann. Rev. Physiol. 41 (1979), 723 - 736

13. Adelstein,R.S., Eisenberg,E.
Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction
Ann. Rev. Biochem. 49 (198o), 921 - 956

14. Endo,M.T., Kitagana,T., Yagi,S., Jino,M., Kakuta,Y.
Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers. Excitation-contraction coupling in smooth muscle
Casteels,R., Godfraind,T., Ruegg,J.C., eds.
Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam (1977), 1o1 - 1o8

15. Kreye,V.A.W., Schlicker,E.
Effects of vasodilator drugs. Alkaline phosphatase and cyclic AMP dependent proteins kinase on the ^{45}calcium uptake of sarcolemmal microsomes from human umbilical arteries
Br. J. Pharmacol. 7o (198o), 537 -544

16. Ebashi,S.
Excitation - contraction coupling
Ann. Rev. Physiol. 45 (1976), 293 - 313

17. Fabiato,A., Fabiato,F.
Calcium and cardiac excitation - contraction coupling
Ann. Rev. Physiol. 41 (1979), 473 - 484

18. Carafoli,E., Clementi,F., Drabikowski,W., Margreth,A.
Calcium transport in contraction and secretion
North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1975)

19. Klee,C.B., Crouch,T.H., Richman,P.G.
Calmodulin
Ann. Rev. Biochem. 49 (1980), 489 - 515

20. Marmé,D.
Calcium, Calmodulin und ihre zelluläre Funktion
Biologie in unserer Zeit 3 (1981), 71 - 77

21. Kretsinger,R.H.
Calcium binding proteins
Ann. Rev. Biochem. 45 (1976), 239 - 266

22. Hartschorne,D.J., Gorecka,A., Aksoy,M.O.
Aspects of the regulatory mechanism in smooth muscle. Excitation - contraction coupling in Smooth Muscle.
Casteels,R., Godfraind,T., Ruegg,J.C.,eds,
Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977), 377 - 384

23. Perry,S.V., Grand,R.J.A.
Mechanism of contraction and the specialized protein components of smooth muscle
Brit. Med. Bull. 35 (1979), 219 - 226

24. Casteels,R., Kitamura,K., Kuriyama,H., Suzuki,H.
Excitation - contraction coupling in the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery
J. Physiol. (London) 271 (1977), 63 - 79

25. Stephenson,E.W.
Ca^{2+}- dependence of stimulated ^{45}Ca - efflux in skinned muscle fibers
J. General. Phys. 77 (1981), 419 - 443

26. Luthra,M.G., Kim,H.D.
Effects of calcium and soluble cytoplasmatic activator protein (calmodulin) on various states of (Ca^{2+}- Mg^{2+})- ATPase activity in isolated membranes of human red cells
Biochim. Biophys. Acta 6oo (198o), 467 - 479

27. Luthra,M.G., Kim,H.D.
(Ca^{2+}- Mg^{2+})- ATPase of density-separated human red cells: effects of calcium and a soluble cytoplasmatic activator (calmodulin)
Biochim. Biophys. Acta 6oo (198o), 48o - 488

28. Mauldin,D., Roufogalis,B.D.
A protein activator of Mg^{2+}- dependent, Ca^{2+}- stimulated ATPase in human erythrocyte membranes distinct from calmodulin
Biochem. J. 187 (1979), 5o7 - 513

29. Triggle,D.J., Swamy,V.C.
Pharmacology of agents that affect calcium agonists and antagonists
Chest 78 (198o), 174 - 179

3o. de Meis,L., Vianna,A.L.
Energy interconvesion by the Ca^{2+}- dependent ATPase of the sarcoplasmatic reticulum
Ann. Rev. Biochem. 48 (1979), 275 - 292

31. Deth,R., van Bremen,C.
Relative contributions of Ca^{2+}- influx and cellular Ca^{2+}- release during drug induced activation of the rabbit aorta
Pflügers Arch. 48 (1974), 13 - 22

32. Droogmans,G., Raemaekers,L., Casteels,R.
Electro- and pharmacomecanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit ear artery
J. Gen. Physiol. 7o (1977), 129 - 148

33. Devine,C.E., Somlyo,A.V., Somlyo,A.P.
Sarcoplasmatic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle
J. Cell. Biol. 52 (1972), 69o - 718

34. Somlyo,A.P., Somlyo,A.V., Shuman,H.
Electron probe analysis of vascular smooth muscle: Composition of mitochondria, nuclei and cytoplasm
J. Cell. Biol. 81 (1979), 316 - 335

35. van Bremen,C.
Transmembrane calcium transport in vascular smooth muscle
In: Vascular Neuroeffector Mechanism, Bevan,J.A., Burnstock,G., Johansson,B., Maxwell, R.A., Nedergaard,O.A., eds, (1976), 67 - 79

36. Wej,J.W., Janis,R.A., Daniel,E.E.
Isolation and characterization of plasma membrane from rat mesenteric arteries
Blood Ves. 13 (1976), 279 - 297

37. Kreye,V.A.W., Reske,S.N., Schultz,K.D.
Vasodilatatorisch wirsame Antihypertensiva Modellsubstanz Natrium-Nitroprussid
Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforschung 43 (1977), 87 - 96

38.Schultz,K.D., Schultz,K., Schultz,G.
Sodium nitroprussid and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens
Nature 265 (1976), 75o - 751

39. Greenberg,S.
Studies on the effect of chronic oral administration of minoxidil and hydralazine on vascular function in spontaneously hypertensive rats
J. Pharmacol. Exp. Ther. 215 (198o), 279 - 286

4o. Perry, H.M.
A method of quantitating 1-hydrazinophtalazine in body fluids
J. Lab. Clin. Med. 41 (1953), 566 - 573

41. Merrill, Z.H., Kenyon, K.
L-hydrazinopthalazine (Apresolin) in the treatment of hypertensive disease - a clinical trial with control groups
Am. J. Med. Sci. 226 (1953), 623 - 631

42. Fries, E.D., Rose, J.C., Higgins, T.F., Finnerty, F.A., Kelley, R.T., Partenope, E.A.
The hemodynamic effects of hypertensive drugs in man
Circulation 8 (1953), 199 - 2o7

43. Ingenito,A.J., Barret,J.P., Procita,L.
Centrally mediated peripherial hypotensive effects of reserpine and hydralazine when perfused through the isolated in situ cat brain
J. Pharmacol. Exp. Ther. 17o (1969), 21o - 22o

44. Lesser,J.M., Israili,Z.H., Davis,E., Dayton,D.G.
Fate of hydralazine-14C in man and dog
Clin. Pharmacol. Ther. 14 (1973), 14o

45. Wagner,J., Faigle,J.W., Imhof,P., Liehr,G.
Metabolism of hydralazine in man
Drug Res. 27 (1977), 2388 - 2395

46. Talseth,T.
Clinical pharmacokinetics of hydralazine
Clinical Pharmacokinetics 2 (1977), 317 - 329

47. Koch-Weser,J.
Drug therapy: hydralazine
N. Engl. J. Med. 295 (1976), 32o - 327

48. Israili,Z.H., Dayton,D.G.
Metabolism of hydralazine
Drug Metab. Rev. 6 (1977), 283 - 3o5

49. Schroeder,H.A.
Current therapeutics: LXXX. - Hydralazine in the control of severe hypertension
The Practitioner 173 (1954), 195 - 2o2

5o. Mc Nay,J.L., Clementi,W.A., Goggin,L.K., Haegele,K.D., Ludden,T.M., Sheperd,A.M.M., Skrdlant,H.B.,Talseth,T.
The pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydralazine and hydralazine hydrazones
In: Arterial hypertension (Velasco,M., Hrsg.)
Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton (198o), 45 - 5o

51. Wilhelm,M., De Stevens,G.
Antihypertensive agents
Progr. Drug Res. 2o (1976), 197 - 259

52. Khatri,W.R., Clemura,N., Natorgiacoma,A., Freis,E.D.
Direct and reflex cardiostimulating effects of hydralazine
Am. J. Cardiol. 4o (1977), 38 - 42

53. Ginks,W.R., Redwood,D.R.
Haemodynamic effects of hydralazine at rest and during exercise in patients with chronic heart failure
Br. Heart J. 44 (198o), 259 - 264

54. Bein,H.J., Gross,F., Tripod,J., Meier,R.
Experimentelle Untersuchungen über die Kreislaufwirkung der blutdrucksenkenden Hydralazinderivate Apresolin und Nepresol
J. Suisse Med. 3 (1953), 1 - 16

55. Packer,M., Meller,J., Gorlin,R., Teichholz,L.,Heyman,M.
Hydralazine induced ischemia without tachycardia: The importance of coronary perfusion pressure gradients
Am. J. Cardiol. 41 (1978), 398

56. Kirkendall,W.M., Page,E.B.
Polyneuritis occuring during hydralazine therapie
J. Am. Med. Assoc. 167 (1958), 427 - 432

57. van Zwieten, P.A.
Pharmakologische und biochemische Wirkungen von Hydralazin und Dihydralazin
Arzneimittel-Forsch. 18 (1968), 79 - 84

58. Chatterjee, K., Parmley, W.W.
Vasodilatator therapy for chronic heart failure
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2o (198o), 475-512

59. Gottlieb, T.B., Katz, F.H., Chidsey, C.A.
Combined therapy with vasodilator drugs and beta-adrenergic blockade in hypertension. A comparative study of minoxidil and hydralazine
Circulation 45 (1972), 571 - 591

6o. Åblad, B.
Site of action of hydralazine and dihydralazine in man
Acta pharmacol. toxicol. 16 (1959), 113 - 128

61. Koch-Weser, J.
The comeback of hydralazine
Am. Heart J. 95 (1978), 1 - 3

62. Linas, S.L.
Minoxidil
Ann. Intern. Med. 94 (1981), 61 - 65

63. Wollam, G.L., Gifford, R.W., Tarazi, R.C.
Antihypertensive drugs: Clinical pharmacology and therapeutic use
Drugs 14 (1977), 42o - 46o

64. O'Malley, K., Velasco, M., Wells, J., McNay, J.L.
Control plasma renin activity and changes in sympathetic tone as determinants of minoxidil induced increase in plasma renin activity
J. Clin. Invest. 55 (1975), 23o - 235

65. Schatzmann, H.J., Bürgin, H.
Calcium in human red blood cells
Annals of the N.Y. Acad. Sci. 3o7 (1978), 125 - 146

66. Bürgin, H., Schatzmann, H.J.
The relation between net calcium, alkali cation and chloride movements in red cells exposed to salicylat
J. Physiol (London) 287 (1979), 15 - 32

67. Betke, K., Savelsberg, W.
Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin
Biochem. Z. 32o (195o), 431 - 439

68. Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden
Springer-Verlag (1968), Berlin-Heidelberg-New York

69. Scharff, O., Foder, B.
Low Ca^{2+}-concentrations controlling two kinetic states of Ca^{2+}-ATPase from human erythrocytes
Biochim. Biophys. Acta 483 (1977), 416 - 424

7o. Blum, R.M., Hofman, J.F.
The membrane locus of the Ca-stimulated K-transport in energy depleted human red blood cells
J. Membrane Biol. 6 (1971), 315 - 328

71. Dreher, K.L., Eaton, J.W., Breslowec, K.P., Berger, E., Blackshear, P.L., White, J.G.
Calcium induced erythrocyte rigidity: The roles of cellular metabolism, hydratation and ionic balance
Am. J. Pathol. 1o1 (198o), 543 - 556

72. Weidekamm, E., Brdiczka, D., DiPauli, G., Wildermuth, M.
Biochemical characterization of segregated membrane vesicles from human erythrocytes with increased intracellular Ca^{2+}
Arch. Biochem. Biophys. 179 (1977), 486 - 494

73. Schatzmann, H.J.
Dependence on calcium concentration and stochiometry of the calcium pump in human red cells
J. Physiol. (London) 235 (1973), 551 - 569

74. Schatzmann, H.J., Vincenzi, F.F.
Calcium movements across the membrane of human red cells
J. Physiol. (London) 2o1 (1969), 369 - 395

75. van Winkle, W.B., Schwartz, A.
Ions and ionophores
Ann. Rev. Physiol. 38 (1976), 247 - 272

76. Ferreira, H.G., Lew, V.L.
Use of ionophore A 23187 to measure cytoplasmatic Ca buffering and activation of the Ca pump by internal Ca
Nature 259 (1976), 47 - 49

77. Wieth, J.O.
Effects of some monovalent anions on chloride and sulphate permeability of human red cells
J. Physiol. (London) 2o7 (197o), 581 - 6o9

78. Wieth, J.O.
Paradoxical temperature dependence of sodium and potassium fluxes in human red cells
J. Physiol. (London) 2o7 (197o), 563 - 58o

79. Wiley, J.F., Gill, F.M.
Red cell calcium leak in congenital haemolytic anaemia with extreme microcytosis
Blood 47 (1976), 197 - 21o

8o. Nayler, W.G., Gran, A., Slade, A.
A protective effect of verapamil on hypoxic heart muscle
Cardiovasc. Res. 1o (1976), 65o - 662

81. Somylo, A.P., Somylo, A.V.
Vascular smooth muscle: II. Pharmacology of normal and hypertensive vessels
Pharmacol. Rev. 22 (197o), 249 - 353

82. Schultz, K.D., Schultz, K., Schultz, G.
Effects of manganese on cyclic GMP levels in the rat ductus deferens
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298 (1977), 197 - 2o4

83. Kreye, V.A.W., Schultz, G.
Inhibition of norepinephrine-, angiotensin II- and vasopressin induced contractions of smooth muscle by acyl derivates of adenosin-3',5'-monophosphate
Europ. J. Pharmacol. 18 (1972), 297 - 3o2

84. Fitzpatrick, D.F., Szentivanyi, A.
The effect of proteinkinase and cyclic nucleotides on calcium (Ca^{2+}) uptake by rabbit aortic microsomes
Pharmacologist 18 (1976), 182

85. Israili, Z.H.
Correlation of pharmacological effects with plasma levels of antihypertensive drugs in man
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19 (1979), 25 - 52

86. Wohl, A.J., Hausler, L.M., Roth, F.E.
The role of calcium in the mechanism of the antihypertensive action of Diazoxid
Life Sciences 7 (1968), 381 - 387

87. Jenne, J.W.
Isoniacid acetylation by human liver and instinal mucosa
Fed. Proc. 22 (1973), 54o

88. Evans, D.A.P., White, T.A.
Human acetylation polymorphism
J. Lab. Clin. Med. 63 (1964), 394 - 4o2

89. Goodman, L.S., Gilman, A.
The pharmacological basis of therapeutics
Macmillan (1975), New York

9o. Dorigotti, L., Rolandi, R., Carpi, C.
A new antihypertensive compound: 3-Hydrazino-6-(N-methyl-N-propan-2-ol)amino-perhydropyridazin (ISF 2123)
Pharm. Res. Com. 8 (1976), 295 - 3o8

91. Pellegrini, R., Abbondati, G.
Characteristics and clinical effects of ISF 2123, a new antihypertensive agent.
Il Farmaco 32 (1977), 19-24

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. E. Schnurr

möchte ich für die in jeder Hinsicht großzügige Unterstützung und für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes recht herzlich danken.

Frau I. Wegling danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen und Fotos.

LEBENSLAUF

1. Angaben zur Person	
Name	Karpi, Jeannette
Geburtsdatum	12.12.1956 in Mainz
Eltern	Rechtsanwalt Nikolai Karpi und Maria Magdalena Karpi, geb. Möhn
Staatsangehörigkeit	deutsch
2. Schulbildung	
1963 - 1966	Volksschule Mainz
1966 - 1975	Rabanus-Maurus-Gymnasium Mainz
Mai 1975	Reifeprüfung
3. Studium	
ab WS 75/76	Studium der Medizin an der Ruhr-Universität Bochum
August 1977	Ärztliche Vorprüfung
ab WS 77/78	Fortsetzung des Studiums an der Universität Düsseldorf
August 1978	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 198o	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1981	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4. Dissertation	
seit SS 79	Dissertation zum Thema "Einfluß verschiedener Antihypertensiva auf das Calcium-Transportsystem des Humanerythrozyten" unter der Leitung von Prof. Dr. med. E. Schnurr an der Universität Düsseldorf
5. Berufstätigkeit	
seit Januar 1982	Assistenzärztin am Dominikus-Krankenhaus, Düsseldorf